昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, April 2016, 59(4): 427 – 437　　doi:10.16380/j.kcxb.2016.04.008

松墨天牛化学感受组织荧光定量 PCR 内参基因的鉴定与筛选

冯　波，郭前爽，毛必鹏，杜永均*

（温州医科大学健康与环境生态研究所，浙江温州 325035）

摘要：【目的】本研究拟选择适合用于分析松墨天牛 *Monochamus alternatus* 化学感受组织中基因表达的内参基因。【方法】依据转录组测序结果进行内参基因鉴定，利用 RT-qPCR 技术分析内参基因在松墨天牛不同发育阶段和不同性别化学感受组织间的表达差异，并利用软件 geNorm，NormFinder 和 BestKeeper 比较其表达的稳定性。【结果】松墨天牛转录组中鉴定出 9 个候选内参基因（*Actin*，*TUB*，18S rRNA，*RPS27A*，*RPS*3，*RPL*10，*AK*，*GAPDH* 和 *EF1A*），其中后 7 个候选内参基因在松墨天牛中被首次鉴定，松墨天牛候选内参基因和其他昆虫相应基因的同源性很高。9 个候选内参基因引物均具有良好的扩增效率，18S rRNA 的表达水平最高，*EF1A* 的表达水平最低；18S rRNA 和 *Actin* 在不同样品间的表达水平差异最大，*GAPDH* 和 *TUB* 表达水平在不同样品间差异最小。geNorm 和 NormFinder 软件分析认为，*GAPDH* 是最稳定的内参基因，*TUB* 是较为稳定的内参基因，18S rRNA 和 *Actin* 是最不稳定的内参基因；BestKeeper 软件分析认为，*GAPDH* 和 *TUB* 是合适的内参基因，18S rRNA 和 *Actin* 是不适合的内参基因。最适合校正松墨天牛化学感受组织中基因表达数据的内参基因数量为 2 个，即 *GAPDH* 和 *TUB*，并且这样的内参基因组合可以用于不同发育阶段和不同性别的不同化学感受组织。【结论】本研究结果为利用 RT-qPCR 技术准确分析松墨天牛和其他天牛基因包括化学感受组织基因相对表达量的内参基因选择提供了重要参考。

关键词：松墨天牛；内参基因；化学感受；发育；荧光定量 PCR

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2016)04-427-11

Identification and selection of valid reference genes for assaying gene expression in the chemosensory tissues of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) by RT-qPCR

FENG Bo, GUO Qian-Shuang, MAO Bi-Peng, DU Yong-Jun* (Institute of Health and Environmental Ecology, Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325035, China)

Abstract:【Aim】This study aims to select suitable internal control genes for gene expression analysis in chemosensory tissues of *Monochamus alternatus*.【Methods】Candidate reference genes were identified from our transcriptome results, and their expression patterns in chemosensory tissues were investigated by RT-qPCR in different developmental stages and both genders. Their expression stabilities were also compared with each other by using softwares geNorm, NormFinder and BestKeeper.【Results】Nine candidate reference genes were identified in *M. alternatus*, including *Actin*, *TUB*, 18S rRNA, *RPS27A*, *RPS*3, *RPL*10, *AK* and *GAPDH*, of which the last seven were firstly identified in this insect species. Candidate reference genes in *M. alternatus* have high nucleotide sequence identity with those from other insects. Designed primers of nine candidate reference genes worked well with high amplification efficiency

基金项目：公益性行业（农业）科研专项基金（201203036）

作者简介：冯波，男，1982 年 5 月生，四川广安人，博士，助理研究员，研究方向为化学生态学，E-mail：fb@wmu.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：dyj@wmu.edu.cn

收稿日期 Received：2015-12-21；接受日期 Accepted：2016-03-21

and specificity to *M. alternatus*. It was found that 18S rRNA had the highest expression level while *EF1A* had the lowest expression level in *M. alternatus*. 18S rRNA and *Actin* had the most variable expression levels between studied chemosensory tissues, but *GAPDH* and *TUB* had the least variable expression levels. *GAPDH* was the most stable reference gene, *TUB* was a moderately stable reference gene, and 18S rRNA and *Actin* were the least stable reference genes in different chemosensory tissues, which was referred from analysis with softwares geNorm and NormFinder. Analysis using BestKeeper software showed that *GAPDH* and *TUB* but not 18S rRNA and *Actin* were the suitable reference genes in chemosensory tissues of *M. alternatus*. The combination of two reference genes, *GAPDH* and *TUB*, was referred as the best internal control combination genes for normalization of RT-qPCR data conducted with chemosensory tissues of different developmental stages (larva, pupa and adult) and different genders of *M. alternatus*. 【Conclusion】The results of this study provide important data for selecting internal reference genes for gene expression analysis of *M. alternatus* and other longhorn beetles, and also for gene expression analysis of chemosensory tissues of other insects by RT-qPCR.

Key words: *Monochamus alternatus*; reference gene; chemosensation; development; RT-qPCR

实时荧光定量反转录 PCR(real-time quantitative reverse transcription-PCR, RT-qPCR)是分子生物学领域研究基因表达的最有效方法之一(Yan *et al*., 2012)。在 RT-qPCR 实验过程中,起始 RNA 质量、cDNA 合成效率等方面的差异可能影响结果,为了去除这些影响因素,需要引入内参基因对数据进行校正和标准化处理(Chen *et al*., 2012)。选择适当的内参基因对于分析结果的准确性至关重要,不合适的内参基因可能导致错误结论(Jian *et al*., 2008)。因此在选择内参基因之前,需要对候选内参基因的有效性进行评估。

理想的内参基因应该稳定表达于不同类型的组织和同一组织的不同处理中,其表达水平不受任何内源性或外源性因素的影响(Janská *et al*., 2013)。过去普遍认为,维持细胞正常生命代谢所必需的持家基因在不同组织及不同实验条件下都具有稳定的表达模式,是理想的内参基因(Thellin *et al*., 1999)。但越来越多的研究表明,这些内参基因在不同物种、不同发育阶段、不同组织及不同试验条件下的表达稳定性存在差异(de Jonge *et al*., 2007; Sun *et al*., 2009; Huis *et al*., 2010)。研究者们开始筛选特定物种体内稳定表达的内参基因。

已经报道过内参基因筛选的物种包括小菜蛾 *Plutella xylostella* (Fu *et al*., 2013),棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Shakeel *et al*., 2015),甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Zhu *et al*., 2014)和其他蛾类(Teng *et al*., 2012),玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera* (Rodrigues *et al*., 2014),大猿叶甲 *Colaphellus bowringi* (Tan *et al*., 2015),马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* (Shi *et al*., 2013)等甲虫及黄黑小斑蝥 *Mylabris cichorii* (Wang *et al*., 2014)等,到目前为止还没有关于天牛内参基因筛选的报道。在进行内参基因筛选时,最常使用的组织为消化道(Fu *et al*., 2012; Peng *et al*., 2012; Lu *et al*., 2013)和整个虫体(Lord *et al*., 2010; Rodrigues *et al*., 2014; Chen and Lu, 2014),也包括头部(Teng *et al*., 2012)、脂肪体(Peng *et al*., 2012; Shi *et al*., 2013)、马氏管(Peng *et al*., 2012)和 Sf21 细胞(Salem *et al*., 2014),以及卵巢(Teng *et al*., 2012)、精巢(Teng *et al*., 2012)、表皮(Shi *et al*., 2013)、丝腺(Teng *et al*., 2012)、血淋巴(Lu *et al*., 2013; Zhu *et al*., 2014)等组织,但是到目前为止几乎没有研究涉及到化学感受组织。

松墨天牛 *Monochamus alternatus* Hope 是国际上公认的重要林业有害生物松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 的主要传播媒介,也是一种严重危害林木的蛀干害虫(Hu *et al*., 2013)。嗅觉在松墨天牛的取食、产卵、寄主转移等个体行为中具有重要的行为调控作用,寄主植物释放的萜烯类挥发性次生物质能够引诱松墨天牛成虫取食(Ikeda *et al*., 1980),生理衰弱和新死松树释放出来的萜烯化合物和乙醇引诱松墨天牛雌虫产卵(Hao *et al*., 2006),松墨天牛成虫可能通过雄性个体分泌的聚集信息素进行通信识别(Teale *et al*., 2011)。本研究利用 RT-qPCR 方法检测松墨天牛不同发育阶段和不同性别的化学感受组织中候选内参基因的表达水平,利用生物学软件 geNorm, NormFinder 和 BestKeeper 评估候选内参基因的稳定性,筛选出适合于松墨天牛化学感受组

织中定量表达分析的内参基因。

1　材料和方法

1.1　供试昆虫

松墨天牛蛹采自浙江宁波松树，将幼虫劈出之后放入 5 mL 指形管中，在温州医科大学健康与环境生态研究所人工气候室进行饲养。幼虫喂以松树碎屑。饲养温度为 26 ± 1℃，相对湿度为 75% ± 5%，光周期为 14L∶10D。成虫羽化后单头饲养在 50 mL 指形管中，喂以新鲜松枝，每 3 d 更换一次松枝。收集老熟幼虫、化蛹 5 d 的蛹及取食 10 d 的成虫用于实验。

在显微镜下，利用显微解剖剪刀分别取下幼虫、蛹、雌成虫和雄成虫的触角和下唇（下颚），雌成虫和雄成虫的足，雄成虫的头部和腹部末端等化学感受组织。在液氮中快速冷冻之后，样品放入 -80℃ 冰箱保存。

1.2　总 RNA 的提取和 cDNA 合成

采用试剂 TRNzol-A$^+$（天根生化科技有限公司，中国）进行总 RNA 的提取，具体方法如下：在液氮中将 10 mg 组织研碎，加入 1 mL TRNzol-A$^+$ 试剂，静置 5 min 后，加入 0.2 mL 氯仿，4℃ 12 000 r/min 离心 15 min 后，向上清液中再次加入 0.2 mL 氯仿，4℃ 12 000 r/min 离心 15 min 后，向上清液中加入等体积异丙醇，-20℃ 放置 2 h 后，4℃ 12 000 r/min 离心 15 min，利用 1 mL 75% 乙醇洗涤沉淀 2 次，最后加入 30 ~ 100 μL 去 RNase 的蒸馏水溶解 RNA。之后用 1% 琼脂糖凝胶电泳，检测总 RNA 完整性。并用紫外分光光度计 NanoDrop2000（ThermoFisher，America）进行浓度和纯度分析。为了保证实验的准确性，电泳结果中均可见清晰的 2 条带（28S rRNA 和 18S rRNA），其条带亮度比值均大于 3∶1，紫外分光光度计测得 OD_{260}/OD_{280} 值在 1.70 ~ 2.05 之间，OD_{260}/OD_{230} 值大于 1 的样品用于后续实验。用 DNase Ⅰ（NEB，America）处理去除 RNA 中的基因组 DNA 污染。

利用逆转录试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Kit（Toyobo，Japan）按照使用说明书进行 RNA 的逆转录，具体方法如下：将 0.5 μg 总 RNA 在 65℃ 条件下处理 5 min 后，置于冰上，分别加入 5 × RT 缓冲液 2 μL，逆转录混合物 0.5 μL，引物混合物 0.5 μL，再利用去 RNA 酶的水补足 10 μL，在 37℃ 条件下逆转录 15 min，最后在 98℃ 条件下处理 5 min 使酶失活。cDNA 于 -20 ℃ 保存，用于 RT-qPCR。

1.3　引物设计和合成

从我们的转录组测序结果中，选择了 9 个常用的内参基因：α-微管蛋白基因（alpha-tubulin gene，*TUBA*），泛素-核糖体蛋白 S27a 基因（ubiquitin-40S ribosomal protein S27a gene，*RPS27A*），60S 核糖体蛋白 L10a 基因（60S ribosomal protein L10a gene，*RPL*10），精氨酸激酶基因（arginine kinase gene，*AK*），甘油醛磷酸脱氢酶基因（glyceraldehyde-3-phosphate gene，*GAPDH*），延伸因子 1A 基因（elongation factor 1 alpha gene，*EF1A*），40S 核糖体蛋白 S3 基因（40S ribosomal protein S3 gene，*RPS*3），18S 核糖体 RNA（18S rRNA）和肌动蛋白基因（*Actin*）。根据得到的基因序列，利用软件 Primer Premier 6.0（Premier，Canada）设计定量分析引物（表 2），各引物的设计长度为 20 ~ 22 个碱基，退火温度为 60℃，扩增产物长度小于 250 bp。引物由上海桑尼生物技术有限公司合成。

1.4　RT-qPCR

使用 TOYOBO 公司的 Thunderbird SYBR qPCR Mix 试剂盒进行 RT-qPCR。PCR 反应体系包括：2 × Thunderbird SYBR qPCR Mix 10 μL，4 倍稀释的 cDNA 模板 1 μL；上下游引物（10 μmol/L）各 1μL，无核酸酶的水补齐到 20 μL。PCR 反应在 Bio-Rad 公司的 C1000™ Thermal Cycler PCR 仪上完成。PCR 反应程序为：95℃ 预变性 3 min；95℃ 变性 10 s，60℃ 退火和延伸共 30 s，在延伸阶段检测荧光强度，收集信号，40 个循环。扩增结束后，做熔解曲线分析以检测扩增产物的特异性，温度为 60 ~ 95℃，升温速度为 0.5℃/S。熔解曲线为单峰时用于后续分析。每次实验设置 3 个平行重复孔。幼虫、蛹、雌成虫和雄成虫的触角和下唇（下颚），雌成虫和雄成虫的足，雄成虫的头部和腹部末端共 12 个样品，每个样品进行 3 次生物学重复。

1.5　标准曲线的绘制和引物扩增效率验证

将反转录得到的 cDNA 模板稀释 2 倍后，依次稀释 5 个梯度，每个梯度稀释 5 倍，分别得到 5^0（原反转录产物的 2 倍稀释液），5^{-1}，5^{-2}，5^{-3} 和 5^{-4} 共 5 个浓度的 cDNA 模板（Su *et al*.，2013），按照 1.4 节进行 RT-qPCR。依据结果，利用线性相关方法分析 cDNA 模板浓度和 Ct 值之间的线性关系，得到相关系数（R^2）和斜率（slope），利用公式 $E = (10^{[-1/slope]} - 1) \times 100$ 计算引物的扩增效率（E）（Radonić *et al*.，2004）。

1.6 数据分析

根据标准曲线将 RT-qPCR 得到的 Ct 值转化为相对定量数据,利用 geNorm (Vandesompele *et al*., 2002)、BestKeeper (Pfaffl *et al*., 2004)和 NormFinder (Andersen *et al*., 2004) 软件严格按照软件使用说明对各候选内参基因进行筛选。在利用 geNorm 分析时,表达稳定值 M 小于 0.5 时即表示该基因为稳定表达(Hellemans *et al*., 2007),配对差异值小于 0.15 时表示不需要再增加内参基因的数量(Vandesompele *et al*., 2002)。在利用 BestKeeper 软件分析时,当标准变异系数(*SD*)大于 1,或者 *P* 值大于 0.05 时,则该基因不适合作为内参基因(Pfaffl *et al*., 2004)。不同发育阶段分析时选用松墨天牛幼虫、雄蛹和雄成虫的触角和下唇须的扩增数据,不同性别分析时选用雌雄成虫触角、下唇须和足的扩增数据,不同组织分析时选用雄成虫触角、足、下唇须、腹部末端和头部的扩增数据,筛选出最优的内参基因。

2 结果

2.1 松墨天牛 9 个内参基因分析

根据我们前期转录组的测序结果,共筛选到 9 个内参基因(表 1),除 *TUB* 和 *Actin* 外,其余 7 个基因在松墨天牛中首次被鉴定,各基因在 GenBank 中的登录号见表 1。*RPS27A*, *RPL*10, *AK*, *GAPDH*, *EF1A* 和 *RPS*3 的基因长度分别为 632, 754, 1 475, 1 335, 2 897 和 832 bp,包含长度分别为 471, 654, 1 071, 1 002, 1 773 和 729 bp 的完整开放阅读框,分别编码 156, 217, 356, 333, 590 和 242 个氨基酸。18S rRNA 的基因长度为 2 115 bp。松墨天牛的这 9 个内参基因和其他昆虫相应基因的核苷酸序列一致性非常高,均高于 74%,部分基因的一致性几乎达到 100%,说明这些内参基因在进化过程中非常保守。

表 1 松墨天牛内参基因在 NCBI 上的 Blastn 结果

Table 1 Blastn results of reference genes of *Monochamus alternatus*

基因名称 Gene name	GenBank 登录号 GenBank accession number	基因长度(bp) Gene size	比对物种 Hit_species	比对基因号 Hit_accession	E 值 E-value	比对长度 Hit_length	一致性(%) Identity
TUB	KU521361	1 579	松墨天牛 *Monochamus alternatus*	EU073050	0	1 579	99.7
RPS27A	KU521362	632	毛蕈甲 *Biphyllus lunatus*	AJ783900	2.7E-150	471	85.6
*RPL*10	KU521363	754	赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*	XM_970465	2.7E-169	666	80.2
AK	KU521364	1 475	赤拟谷盗 *T. castaneum*	XM_966707	0	1 430	76.9
GAPDH	KU521365	1 335	烟粉虱 *Bemisia tabaci*	KC161214	0	978	76.9
EF1A	KU521366	2 897	黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*	NM_001298945	0	1285	74.9
*RPS*3	KU521367	832	赤拟谷盗 *T. castaneum*	XM_008194244	0	759	79.8
Actin	KU521368	1 600	松墨天牛 *M. alternatus*	EU100951	0	1 361	99.2
18S rRNA	KU521369	2 115	芒天牛 *Pogonocherus hispidulus*	JN619131	0	1 898	99.4

2.2 引物扩增效率及特异性

本试验利用梯度稀释的 cDNA 作为模板进行 RT-qPCR 扩增后绘制每个内参基因的标准曲线,得到每个基因定量分析引物的相关参数(R^2)(表 2)。从表 2 中可以看到 9 个内参基因的线性相关系数变化范围为 0.994~1.000,表明 cDNA 初始模板量与其相应的 Ct 值线性关系明确,得到的线性相关方程可靠。根据 $E=(10^{[-1/\text{slope}]}-1)\times100$ 计算得到的扩增效率为 102.3% ~109.4%,均大于 100%,表明 RT-qPCR 反应的有效性。模板与 Ct 值间的良好线性关系和反应的有效性确保了定量结果准确可靠。

2.3 不同样品中内参基因的表达水平差异

本研究一共使用了幼虫、蛹和成虫的 12 个组织,RT-qPCR 结果显示如图 1。9 个内参基因在研究所用组织中的 Ct 值范围为 6.5~27.3,表明 9 个内参基因的表达量均较高,其中,18S rRNA 的表达量最高,平均 Ct 值为 10.0; *EF1A* 的表达量最低,平均 Ct 值为 24.1; *TUB* 和 *GAPDH* 的平均 Ct 值分别

表 2　本实验所用引物序列、扩增效率及线性相关系数

Table 2　Sequence, amplification efficiency and correlation coefficient of the primers used in our study

基因名称 Gene name	正向引物(5′-3′) Forward primer	反向引物(5′-3′) Reverse primer	扩增产物长度(bp) Amplicon size	扩增效率(%) Amplification efficiency	线性相关系数 R^2 Correlation coefficient
18S rRNA	AGAAACGGCTACCACATCCA	GCGGGACACAGATTCGACTA	253	107.1	0.997
Actin	CGAACAGGAAATGGCTACCG	CGTCGCACTTCATGATGGAG	191	112.3	0.997
AK	TCCCGCTGGTGAATTTGTTG	AGCCTGCAAGAAACGATCAC	250	103.8	1.000
EF1A	GACAGCTCCATTTTCCACGTTG	TTCGGGCGCTTTTCCAAATG	76	108.2	1.000
GAPDH	TCGAACGCTTCATGCACAAC	CCATCACGCCACAATTTTCC	155	103.1	1.000
*RPL*10	GACAAACGTTTCAGCGGAAC	TGCTGTTGATCGCCCAAAAC	83	106.7	0.998
*RPS*3	ATGTGGAGCTAAAGGTTGCG	AAACGTTATCGGGCAAAGGC	242	108.9	0.999
TUB	AATCACCAACGCCTGTTTCG	TGGCAATAGCAGCGTTTACG	131	109.4	0.994
RPS27A	CGCCGGAAAACAATTGGAAG	GCATTCACGTCTCAATCTGTGG	229	105.7	0.999

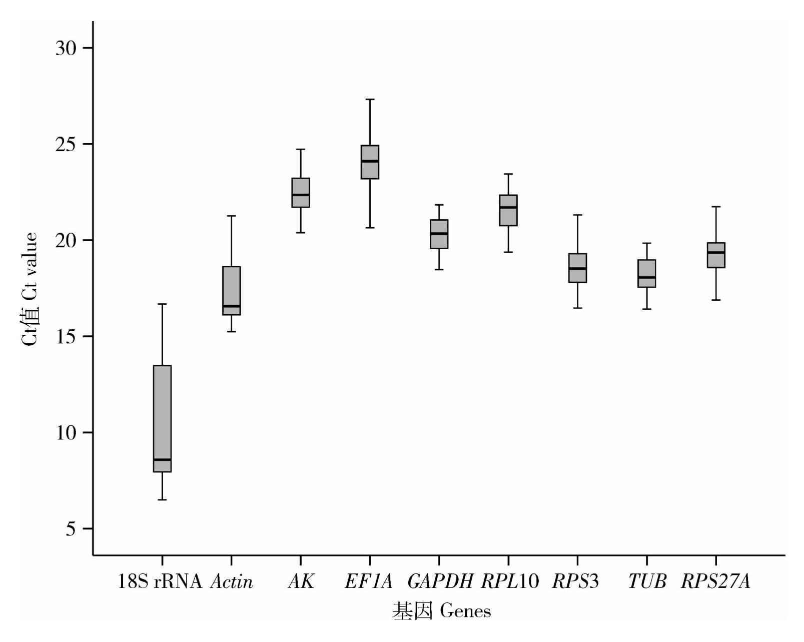


图 1　9 个候选内参基因在松墨天牛所有组织中的表达比较

Fig. 1　Expression comparison of nine candidate reference genes in all the tested tissues of *Monochamus alternatus*

为 18.1 和 20.3。18S rRNA 在不同样品间的表达量差异最大，Ct 值的最大差异为 10.2；*GAPDH* 和 *TUB* 在不同样品间的表达量差异最小，Ct 值的最大差异仅为 3.4。不过，除 18S rRNA 和 *Actin* 外，四分位差(interquartile range, IQR)分别为 5.5 和 2.5，其余各内参基因的 IQR 值的范围为 1.3 ~ 1.7，十分接近。

2.4　geNorm 软件分析

geNorm 通过计算基因表达稳定值 M，对所有候选内参基因的表达稳定度进行排序，M 值越小表明所选的内参基因越稳定。由图 2 可知，对于松墨天牛不同发育阶段，*AK* 和 *GAPDH* 是最稳定的内参基因，*TUB* 也是稳定的内参基因。对于不同性别而言，*TUB* 和 *GAPDH* 是稳定的内参基因。对于同一性别的不同组织而言，*AK* 和 *GAPDH* 是最稳定的内参基因，*TUB* 和 *RPS*3 也是稳定的内参基因。内参基因 18S rRNA 和 *Actin* 在不同发育阶段之间、不同性别之间和同一性别不同组织之间的稳定值均较大。

在基因表达分析时，往往需要使用 2 或 2 个以上的内参基因对目的基因进行校正，从而减少试验误差，得到更加准确的结果。geNorm 软件通过分析内参基因的配对差异值 Vn/n + 1 变化能确定在某种条件下所需内参基因的最适数目。本研究中，除了 V8/9 值外，其余 Vn/n + 1 值均在 0.1 左右，小于程序推荐值 0.15(图 3)，说明在对不同发育阶段之间、不同性别之间和同一性别不同组织之间进行基因表达分析时无需加入第 3 个内参基因进行数据校正，最合适的内参基因数目是 2 个。

A
表达稳定值 Expression stability value
2.0 1.6 1.2 0.8 0.4 0
18S rRNA *Actin* *EF1A* *RPS27A* *RPS3* *RPL10* *TUB* *AK* *GAPDH*
基因 Genes

B
表达稳定值 Expression stability value
1.6 1.2 0.8 0.4 0
Actin *RPS27A* 18S rRNA *AK* *EF1A* *RPL10* *RPS3* *GAPDH* *TUB*
基因 Genes

C
表达稳定值 Expression stability value
1.6 1.2 0.8 0.4 0
Actin *RPS27A* 18S rRNA *AK* *EF1A* *RPL10* *RPS3* *GAPDH* *TUB*
基因 Genes

图 2 GeNorm 软件分析的依次删除最不稳定内参基因后所有基因在松墨天牛不同发育阶段(A)、性别(B)和组织(C)中的表达稳定值 M

Fig. 2 Expression stability value M of all remaining reference genes after stepwise exclusion of the least stable reference genes in different developmental stages (A), genders (B) and tissues (C) of *Monochamus alternatus*

右边为最稳定内参基因,左边的为最不稳定内参基因。虚线表示表达稳定值 M 为 0.5。More stably expressed genes are positioned on the right side, while less stably expressed on the left side. The dashed line indicates that the stability value M is 0.5.

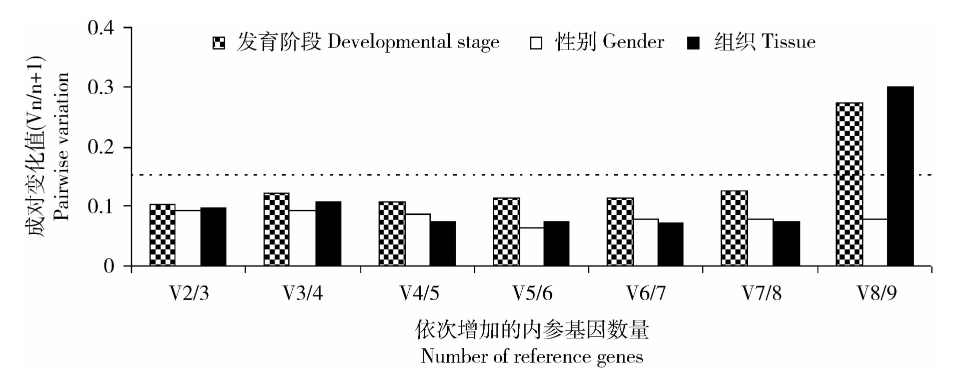


图 3 从最稳定内参基因开始依次增加内参基因时正态因子间的成对变化值

Fig. 3 Pairwise variation (Vn/n+1) between normalization factors after stepwise inclusion of stable reference genes from the most stably expressed genes

虚线表示成对变化值为 0.15。The dashed line indicates that the pariwise variation is 0.15.

2.5 NormFinder 软件分析

NormFinder 通过综合计算内参基因在同一组内的表达稳定值来筛选内参基因,以筛选最佳内参基因。稳定值越大,内参基因越不稳定,稳定值

越小，内参基因越稳定。本研究发现，对于不同发育阶段和不同性别而言，*GAPDH* 的稳定值最小，对于同一性别的不同组织而言，*TUB* 的稳定值最小。18S rRNA 和 *Actin* 在不同发育阶段、不同性别和同一性别不同组织之间的稳定值均最大。奇怪的是，除了不同性别之间外，NormFinder 推荐的用于不同发育阶段之间和同一性别不同组织之间的最佳引物组合均不含有推荐的最佳内参基因（表 3）。

表 3　通过 NormFinder 软件分析获得的候选内参基因在松墨天牛不同发育阶段、性别和组织中的表达稳定值排序

Table 3　The ranking order of the expression stability value of candidate reference genes in different developmental stages, genders and tissues of *Monochamus alternatus* calculated by NormFinder

基因 Genes	表达稳定值 Expression stability value		
	发育阶段 Developmental stage	性别 Gender	组织 Tissue
18S rRNA	0.221	0.320	0.224
Actin	0.119	0.252	0.069
AK	0.039	0.161	0.041
EF1A	0.052	0.163	0.037
GAPDH	0.017	0.103	0.034
*RPL*10	0.065	0.208	0.038
*RPS*3	0.043	0.140	0.054
TUB	0.042	0.151	0.024
RPS27A	0.089	0.250	0.061
最佳组合 Best combination	0.025 (*EF1A*, *TUB*)	0.070 (*GAPDH*, *RPS*3)	0.016 (*EF1A*, *RPL*10)

最后一行括号中为 NormFinder 软件推荐的 2 个最佳组合内参基因。
Two best reference genes were listed in the parentheses of the last row.

2.6　BestKeeper 软件分析

BestKeeper 软件分析主要以标准变异系数（*SD*）、变异相关系数（*CV*）、皮尔逊相关系数（*CC*）和概率值（*P*）来判断内参基因的表达稳定性，*SD* 值和 *CV* 值越小，*CC* 值越大，表明该基因的表达越稳定。从表 4 中数据可以看出，对于不同发育阶段而言，18S rRNA，*Actin*，*EF1A*，*RPL*10，*RPS*3 和 *RPS27A* 由于其标准变异系数大于 1，并不适合作为内参基因。对于不同性别而言，*Actin* 和 *EF1A* 由于其标准变异系数大于 1，*RPL*10 由于其概率值大于 0.05，并不适合作为内参基因。对于同一性别的不同组织而言，18S rRNA，*Actin*，*AK* 和 *EF1A* 由于其标准变异系数大于 1，18S rRNA，*Actin*，*EF1A*，*RPL*10，*RPS*3 和 *RPS27A* 由于其标准变异系数大于 1，*RPL*10 和 *RPS*3 由于其概率值大于 0.05，均不适合作为内参基因。

2.7　以 *GAPDH* 和 *TUB* 为内参时各基因的表达量比较

分别利用 *GAPDH* 和 *TUB* 为内参，计算各基因在各组织中的相对表达量（图 4）。以 *GAPDH* 为内参时，*TUB* 在各组织中的相对表达量差异较小，最大差异 4.7 倍。*RPS*3 在各组织中的相对表达量差异也较小，最大差异 5.1 倍。其余各基因在各组织中的相对表达量差异均较大，最大差异倍数均大于 11 倍。以 *TUB* 为内参时，*GAPDH* 在各组织中的相对表达量差异较小，最大差异 4.8 倍。其余各基因在各组织中的相对表达量差异均较大，最大差异倍数均大于 8.7 倍。18S rRNA 和 *Actin* 在各组织中的相对表达量差异很大，最大差异倍数均大于 100 倍。

表 4　利用 BestKeeper 软件评价 9 种内参候选基因在松墨天牛化学感受组织中的稳定性

Table 4　Stability of nine candidate reference genes in the olfactory tissues of *Monochamus alternatus* based on quantification cycle values（Cq）evaluated using the BestKeeper software

		18S rRNA	*Actin*	*AK*	*EF1A*	*GAPDH*	*RPL*10	*RPS*3	*TUB*	*RPS27A*
发育阶段 Developmental stage	*SD* [± *CP*]	2.59	1.43	0.99	1.84	0.82	1.19	1.11	0.63	1.45
	CV [% *CP*]	24.89	8.11	4.42	7.60	4.06	5.58	5.96	3.48	7.56
	CC [*r*]	0.63	−0.23	0.65	0.93	0.89	0.02	0.53	0.41	−0.29
	P	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	0.93	0.00	0.02	0.09
性别 Gender	*SD* [± *CP*]	0.46	1.25	0.92	1.11	0.99	0.58	0.85	0.72	0.69
	CV [% *CP*]	5.87	7.11	4.00	4.73	4.84	2.62	4.50	3.94	3.46
	CC [*r*]	0.78	0.55	0.70	0.88	0.89	0.32	0.69	0.82	−0.39
	P	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.02
组织 Tissue	*SD* [± *CP*]	2.74	1.03	1.03	1.22	0.68	0.58	0.72	0.72	0.71
	CV [% *CP*]	28.37	6.10	4.49	5.10	3.34	2.62	3.83	3.89	3.53
	CC [*r*]	0.74	0.08	0.38	0.86	0.56	0.36	0.01	0.87	−0.39
	P	0.00	0.65	0.03	0.00	0.00	0.05	0.94	0.00	0.03

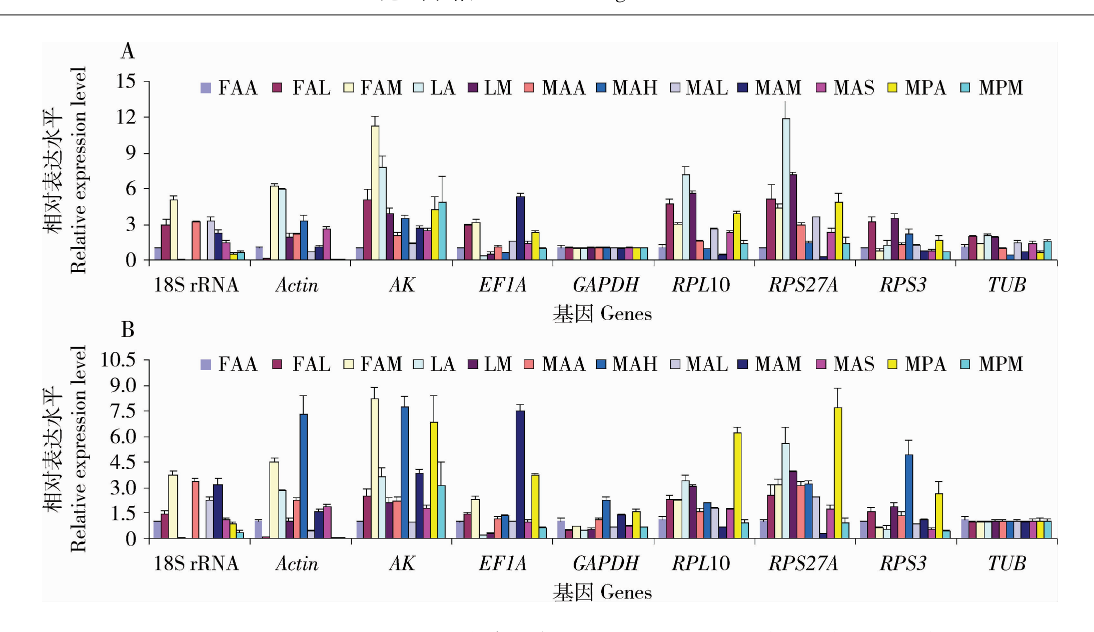


图 4 以 *GAPDH*(A)和 *TUB*(B)为内参时各基因在松墨天牛不同组织中的相对表达量

Fig. 4 Relative expression level of genes in different tissues of *Monochamus alternatus* relative to that of *GAPDH* (A) and *TUB* (B) as reference genes

基因在 FAA 中的表达量为对照,定为 1,在其余组织中的表达量以 FAA 为对照进行计算;误差线表示标准差。The expression level in female adult antenna was arbitrarily defined as 1, and those in other tissues were normalized to them. Error bars represent standard error (*SE*). FAA: 雌成虫触角 Antenna of female adult; FAL: 雌成虫足 Leg of female adult; FAM: 雌成虫下唇(下颚)Labium (maxilla) of female adult; LA: 幼虫触角 Larval antenna; LM: 幼虫下唇(下颚)Larval labium (maxilla); MAA: 雄成虫触角 Antenna of male adult; MAH: 雄成虫头部 Head of male adult; MAL: 雄成虫足 Leg of male adult; MAM: 雄成虫下唇(下颚)Labium (maxilla) of male adult; MAS: 雄成虫腹部末节 The last abdominal segment of male adult; MPA: 雄蛹触角 Male pupal antenna; MPM: 雄蛹下唇(下颚)Male pupal labium (maxilla).

3 讨论

目前常用的 RT-qPCR 内参基因包括 *GAPDH*、*actin*、*RPS27A*、泛素结合酶(ubiquitin conjugating enzyme gene, *UBC*)、18S rRNA、28S 核糖体 RNA (28S rRNA)、*EF1A*、*TUB*、翻译延长因子基因(translation elongation factor gene, *TEF*)、*RPL*10、*AK*、*RPS*3 等(Nolan *et al.*, 2006)。研究发现,内参基因在不同物种、不同发育阶段和不同组织中的表达稳定性存在差异,应该根据研究物种和研究目的选择合适的内参基因(de Jonge *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2009; Huis *et al.*, 2010)。松墨天牛虽然是林业上的重大害虫,但是 GenBank 中仅能找到 *TUB* (Song *et al.*, 2008)和 *Actin* 2 个常用内参基因的序列。我们在前期转录组测序结果中,新筛选到 *RPS27A*, *RPL*10, *AK*, *GAPDH*, *EF1A*, *RPS*3 和 18S rRNA 7 个常用内参基因,前 6 个编码氨基酸的基因均包含完整的开放阅读框。松墨天牛的 9 个常用内参基因和其他昆虫相应基因的相似性非常高,说明这些基因在进化过程中非常保守。

松墨天牛基因表达研究中,使用的内参基因为 *β-actin* (Lin *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2015)和 18S rRNA (Qian *et al.*, 2015)。肌动蛋白是真核生物中广泛存在的一种蛋白质,是微丝的结构成分,在真核细胞进化过程中高度保守,被广泛用于基因表达的内参基因(Rodrigues *et al.*, 2014; Kumari *et al.*, 2015)。核糖体 RNA 是核糖体中起主要作用的结构成分,存在于所有生物中,被认为是细胞中最稳定表达的基因(Smit *et al.*, 2007),在研究人类组织细胞时,常被作为内参基因用于基因表达研究(Goidin *et al.*, 2001)。本研究发现,*actin* 和 18S rRNA 在各化学感受组织间的表达差异均大于其他候选内参基因, geNorm, NormFinder 和 BestKeeper 的分析结果表明 *β-actin* 和 18S rRNA 在所用化学感受组织间的表达非常不稳定,否定了 *β-actin* 和 18S rRNA 作为松墨天牛化学感受组织基因表达研究的内参基因。*Actin* 和 18S rRNA 不适合作为基因表达研究的内参基因在其他物种中也有报道,例如 *actin* 不适合作为家蚕 *Bombyx mori*, 甜菜夜蛾 *S. exigua* 和马铃薯甲虫 *L. decemlineata* 不同发育阶段的基因表达内参基因(Teng *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2013),18S rRNA 不适合作为 Bt 毒素诱导小菜蛾基因表达研究的内参基因(Fu *et al.*, 2012)。

GAPDH 是生物体内糖酵解、糖异生及光合作用碳固定循环过程中的关键酶，在进化上十分保守。本研究发现，使用的 9 个候选内参基因中，*GAPDH* 在不同样品间的 Ct 值差异最小，geNorm 和 NormFinder 软件计算的基因表达稳定值最低，同时完全符合 BestKeeper 规定的作为内参基因的要求，说明 *GAPDH* 在松墨天牛不同发育阶段、不同性别的化学感受组织中的表达非常稳定，是松墨天牛化学感受组织表达研究中最合适的内参基因，可以用于不同发育阶段、不同性别和同一性别不同组织的化学感受组织中基因表达研究。*GAPDH* 的组织表达稳定性也在 *B. mori* 中得到了证实（Teng *et al*., 2012）。虽然有研究发现 *GAPDH* 在脊椎动物组织中的表达不稳定（Jacob *et al*., 2013），但也有研究指出 *GAPDH* 在不同类型的人类胎盘中的表达非常稳定（Murthi *et al*., 2008），造成这种差异的原因可能是由于脊椎动物基因组中存在大量的 *GAPDH* 假基因（pseudogene）（Sun *et al*., 2012）。

TUB 与细胞形态的维持、细胞内物质的运输、细胞运动及细胞分裂增殖等生命活动密切相关。本研究发现，*TUB* 基因在不同样品间的表达差异也很小，geNorm 计算发现 *TUB* 在不同发育阶段、不同性别和同一性别不同组织间的基因表达稳定值均低于 0.5，NormFinder 软件计算的表达稳定值也较低，完全符合 BestKeeper 规定的作为内参基因的要求，因此 *TUB* 也是松墨天牛化学感受组织基因表达研究中的优秀内参基因。*TUB* 作为基因表达内参基因也在长红锥蝽 *Rhodnius prolixus*（Paim *et al*., 2012）和棉花粉蚧 *Phenacoccus solenopsis*（Chen and Lu, 2014）中得到证实。

使用单一内参基因进行 RT-qPCR 数据校准和标准化，可能会对结果的精确性产生影响，因此在 RT-qPCR 数据标准化过程中，应该使用多个内参基因进行校正（Vandesompele *et al*., 2002）。本研究发现，当增加内参基因数量时，geNorm 软件计算的配对差异值变化小于程序推荐值 0.15，因此在研究松墨天牛化学感受组织基因表达时，最合适的内参基因数目是 2 个。*GAPDH* 和 *TUB* 是松墨天牛化学感受组织中表达最稳定的两个内参基因，其表达水平相近，满足内参基因组合时的各项要求（Yuan *et al*., 2012），是松墨天牛化学感受组织基因表达分析时的推荐内参基因组合。

本研究从松墨天牛中新鉴定出 7 个候选内参基因，并利用 RT-qPCR 技术和 3 种软件首次对不同化学感受组织中的内参基因进行筛选，发现 *GAPDH* 是松墨天牛化学感受基因表达分析的首选内参基因，内参基因 *GAPDH* 和 *TUB* 组合足以对松墨天牛化学感受基因的表达进行有效校正。由于内参基因的稳定性与物种类别、实验条件、组织类型等有很大相关性（Sun *et al*., 2009; Huis *et al*., 2010），本研究基于松墨天牛化学感受组织进行的内参基因筛选结果，是否适用于其他昆虫化学感受组织以及松墨天牛其他组织的 RT-qPCR，还有待于进一步研究。在进行 RT-qPCR 内参基因选择时，应根据特定的研究目的仔细分析和评价内参基因的稳定性（de Jonge *et al*., 2007）。本研究结果为利用 RT-qPCR 技术准确分析松墨天牛和其他天牛基因包括化学感受组织基因相对表达量的内参基因选择提供了重要的参考。

参考文献（References）

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF, 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*., 64(15): 5245–5250.

Chen F, Lu YY, 2014. Selection of reference genes in *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae) under heat stress. *Acta Entomologica Sinica*, 57(10): 1146–1154. [陈芳, 陆永跃, 2014. 热胁迫下棉花粉蚧内参基因的筛选. 昆虫学报, 57(10): 1146–1154]

Chen XR, Zhang BY, Xing YP, Tong YH, Xu JY, 2012. Selection of internal control genes for real-time RT-PCR data normalization in *Phytophthora cactorum*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 28(30): 201–207. [陈孝仁, 张博月, 邢玉平, 童蕴慧, 徐敬友, 2012. 恶疫霉实时定量 RT-PCR 分析中内参基因的选择. 中国农学通报, 28(30): 201–207]

de Jonge HJM, Fehrmann RSN, de Bont ESJM, Hofstra RMW, Gerbens F, Kamps WA, de Vries EGE, van der Zee AGJ, te Meerman GJ, ter Elst A, 2007. Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS ONE*, 2(9): e898.

Fu W, Xie W, Zhang Z, Wang S, Wu Q, Liu Y, Zhou X, Zhou X, Zhang Y, 2013. Exploring valid reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Int. J. Biol. Sci*., 9(8): 792–802.

Fu W, Xie W, Zhang Z, Wu QJ, Wang SL, Zhang YJ, 2012. Selection of valid reference genes for gene expression studies by quantitative real-time PCR in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) after exuosure to Bt toxin. *Acta Entomologica Sinica*, 55(12): 1406–1412. [符伟, 谢文, 张卓, 吴青君, 王少丽, 张友军, 2012. Bt 毒素诱导下小菜蛾实时定量 PCR 内参基因的筛选. 昆虫学报, 55(12): 1406–1412]

Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O,

2001. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and β-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal. Biochem.*, 295(1): 17–21.

Hao D, Ma F, Wang Y, Zhang Y, Dai H, 2006. Electroantennogram and behavioral responses of *Monochamus alteruatus* to the volatiles from *Pinus thunbergii* with different physiological status. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 17(6): 1070–1074. [郝德君, 马凤林, 王焱, 张永慧, 戴华国, 2006. 松墨天牛对不同生理状态黑松挥发物的触角电生理和行为反应. 应用生态学报, 17(6): 1070–1074]

Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J, 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.*, 8(2): R19.

Hu S, Ning T, Fu D, Haack RA, Zhang Z, Chen D, Ma X, Ye H, 2013. Dispersal of Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae), in mainland China as inferred from molecular data and associations to indices of human activity. *PLoS ONE*, 8(2): e57568.

Huis R, Hawkins S, Neutelings G, 2010. Selection of reference genes for quantitative gene expression normalization in flax (*Linum usitatissimum* L.). *BMC Plant Biol.*, 10(1): 71.

Ikeda T, Enda N, Yamane A, Oda K, Toyoda T, 1980. Attractants for the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 15: 358–361.

Jacob F, Guertler R, Naim S, Nixdorf S, Fedier A, Hacker NF, Heinzelmann-Schwarz V, 2013. Careful selection of reference genes is required for reliable performance of RT-qPCR in human normal and cancer cell lines. *PLoS ONE*, 8(3): e59180.

Janská A, Hodek J, Svoboda P, Zámečník J, Prášil IT, Vlasáková E, Milella L, Ovesná J, 2013. The choice of reference gene set for assessing gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) under low temperature and drought stress. *Mol. Genet. Genomics*, 288(11): 639–649.

Jian B, Liu B, Bi Y, Hou W, Wu C, Han T, 2008. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. *BMC Mol. Biol.*, 9(1): 1–14.

Kumari K, Pathakota GB, Annam PK, Kumar S, Krishna G, 2015. Characterisation and validation of house keeping gene for expression analysis in *Catla catla* (Hamilton). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(4): 993–1000.

Lin T, Zhang YH, Chang RL, Zhang Q, Wen XJ, 2009. Cloning and expression of the ubiquitin gene of *Monochamus alternatus*. *Scientia Silvae Sinicae*, 45(9): 101–105. [林同, 张宇宏, 常润磊, 张琪, 温秀军, 2009. 松褐天牛泛素基因的克隆及表达. 林业科学, 45(9): 101–105]

Lord JC, Hartzer K, Toutges M, Oppert B, 2010. Evaluation of quantitative PCR reference genes for gene expression studies in *Tribolium castaneum* after fungal challenge. *J. Microbiol. Methods*, 80(2): 219–221.

Lu Y, Yuan M, Gao X, Kang T, Zhan S, Wan H, Li J, 2013. Identification and validation of reference genes for gene expression analysis using quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS ONE*, 8(7): e68059.

Luo LL, Wu HJ, Lin T, 2015. Characterization and expression of subunit D gene of ATP synthase from *Monochamus alternatus*. *Scientia Silvae Sinicae*, 51(7): 60–68. [罗淋淋, 吴华俊, 林同, 2015. 松墨天牛 ATP 合成酶 D 亚基基因的鉴定与表达. 林业科学, 51(7): 60–68]

Murthi P, Fitzpatrick E, Borg AJ, Donath S, Brennecke SP, Kalionis B, 2008. *GAPDH*, 18S rRNA and *YWHAZ* are suitable endogenous reference genes for relative gene expression studies in placental tissues from human idiopathic fetal growth restriction. *Placenta*, 29(9): 798–801.

Nolan T, Hands RE, Bustin SA, 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protocols*, 1(3): 1559–1582.

Paim RM, Pereira MH, Di Ponzio R, Rodrigues JO, Guarneri AA, Gontijo NF, Araújo RN, 2012. Validation of reference genes for expression analysis in the salivary gland and the intestine of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) under different experimental conditions by quantitative real-time PCR. *BMC Res. Notes*, 5: 128.

Peng R, Zhai Y, Ding H, Di T, Zhang T, Li B, Shen W, Wei Z, 2012. Analysis of reference gene expression for real-time PCR based on relative quantitation and dual spike-in strategy in the silkworm *Bombyx mori*. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* (*Shanghai*), 44(7): 614–622.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP, 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.*, 26: 509–515.

Qian K, Feng B, Wu XL, Lao C, Shen YL, Du YJ, 2015. Cloning, sequence analysis, tissue expression profiling and prokaryotic expression of odorant binding protein genes *MaltOBP*2 and *MaltOBP*6 from *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(5): 496–506. [钱凯, 冯波, 巫诩亮, 劳冲, 沈幼莲, 杜永均, 2015. 松墨天牛 OBP 基因 *MaltOBP*2012 和 *MaltOBP*2016 的克隆、序列分析及组织表达谱和原核表达研究. 昆虫学报, 58(5): 496–506]

Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A, 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313(4): 856–862.

Rodrigues TB, Khajuria C, Wang H, Matz N, Cardoso DC, Valicente FH, Zhou X, Siegfried B, 2014. Validation of reference housekeeping genes for gene expression studies in western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). *PLoS ONE*, 9(10): e109825.

Salem TZ, Allam WR, Thiem SM, 2014. Verifying the stability of selected genes for normalization in Q PCR experiments of *Spodoptera frugiperda* cells during AcMNPV infection. *PLoS ONE*, 9(10): e108516.

Shakeel M, Zhu X, Kang T, Wan H, Li J, 2015. Selection and evaluation of reference genes for quantitative gene expression studies

in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Asia-Pacific Entomol.*, 18(2): 123–130.

Shi XQ, Guo WC, Wan PJ, Zhou LT, Ren XL, Ahmat T, Fu KY, Li GQ, 2013. Validation of reference genes for expression analysis by quantitative real-time PCR in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *BMC Res. Notes*, 6: 93.

Smit S, Widmann J, Knight R, 2007. Evolutionary rates vary among rRNA structural elements. *Nucleic Acids Res.*, 35(10): 3339–3354.

Song L, Liu XX, Zhang YA, Zhang QW, Zhao ZW, 2008. The cloning and expression of α-tubulin in *Monochamus alternatus*. *Insect Mol. Biol.*, 17(5): 495–504.

Su X, Fan B, Yuan L, Cui X, Lu S, 2013. Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis of gene expression in *Populus trichocarpa*. *Chinese Bulletin of Botany*, 48(5): 507–518. [苏晓娟, 樊保国, 袁丽钗, 崔秀娜, 卢善发, 2013. 实时荧光定量 PCR 分析中毛果杨内参基因的筛选和验证. 植物学报, 48(5): 507–518]

Sun H, Meng Y, Cui G, Cao Q, Li J, Liang A, 2009. Selection of housekeeping genes for gene expression studies on the development of fruit bearing shoots in Chinese jujube (*Ziziphus jujube* Mill.). *Mol. Biol. Rep.*, 36(8): 2183–2190.

Sun Y, Li Y, Luo D, Liao DJ, 2012. Pseudogenes as weaknesses of ACTB (Actb) and GAPDH (Gapdh) used as reference genes in reverse transcription and polymerase chain reactions. *PLoS ONE*, 7(8): e41659.

Tan QQ, Zhu L, Li Y, Liu W, Ma WH, Lei CL, Wang XP, 2015. A de novo transcriptome and valid reference genes for quantitative real-time PCR in *Colaphellus bowringi*. *PLoS ONE*, 10(2): e0118693.

Teale SA, Wickham JD, Zhang F, Su J, Chen Y, Xiao W, Hanks LM, Millar JG, 2011. A male-produced aggregation pheromone of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae), a major vector of pine wood nematode. *J. Econ. Entomol.*, 104(5): 1592–1598.

Teng X, Zhang Z, He G, Yang L, Li F, 2012. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in four lepidopteran insects. *J. Insect Sci.*, 12: 60.

Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E, 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.*, 75(2–3): 291–295.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 3(7): research0034.

Wang Y, Wang ZK, Huang Y, Liao YF, Yin YP, 2014. Identification of suitable reference genes for gene expression studies by qRT-PCR in the blister beetle *Mylabris cichorii*. *J. Insect Sci.*, 14: 94.

Xu W, Luo LL, Wu HJ, Wei CM, Lin T, 2014. Cloning and expression profiling of a cuticular protein gene in *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(5): 515–521. [许雯, 罗淋淋, 吴华俊, 韦春梅, 林同, 2014. 松墨天牛表皮蛋白基因的克隆及表达分析. 昆虫学报, 57(5): 515–521]

Yan J, Yuan F, Long G, Qin L, Deng Z. 2012. Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis in citrus. *Mol. Biol. Rep.*, 39(2): 1831–1838.

Yuan W, Wan H, Yang Y, 2012. Characterization and selection of reference genes for real-time quantitative RT-PCR of plants. *Chinese Bulletin of Botany*, 47(4): 427–436. [袁伟, 万红建, 杨悦俭, 2012. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的特点及选择. 植物学报, 47(4): 427–436]

Zhu X, Yuan M, Shakeel M, Zhang Y, Wang S, Wang X, Zhan S, Kang T, Li J, 2014. Selection and evaluation of reference genes for expression analysis using qRT-PCR in the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS ONE*, 9(1): e84730.

(责任编辑：袁德成)